Novembre 2014

Notice QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA

Σ 2 × 96

Test de sang total IFN-γ mesurant les réponses aux stimulants immunitaires innés et adaptatifs

Version 1

IVD Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*

CE

REF 0650-0201

QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, ÉTATS-UNIS

EC REP QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, ALLEMAGNE

1079024FR Rév. 01

www.QuantiFERON.com

QIAGEN®

Sommaire

Utilisation prévue **4**

Résumé et explication du test **4**

Principes du test 5

Temps requis pour effectuer le test 6

Composants et stockage **6**

Matériel nécessaire (mais non fourni) 8

Stockage et manipulation 8

Avertissements et précautions **10**

Avertissements 10

Précautions 11

Prélèvement et manipulation des échantillons **13**

Instructions d'utilisation **17**

Calculs et interprétation du test **24**

Génération de la courbe de standard 24

Contrôle qualité du test 25

Interprétation des résultats 25

Limites **27**

Caractéristiques des performances **27**

Études cliniques 27

Caractéristiques des performances du test 32

Informations techniques **33**

Échantillons de plasma coagulé 33

Guide de dépannage **34**

Références **37**

Symboles **37**

Coordonnées **38**

Résumé de la procédure du test **39**

Utilisation prévue

Le test QuantiFERON Monitor (QFM) est un test de diagnostic *in vitro* destiné à la détection de la fonction immunitaire à médiation cellulaire par la mesure de l'interféron gamma (IFN-γ) dans le plasma au moyen du dosage d'immuno-absorption par enzyme liée (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) après l'incubation de sang total héparinisé à l'aide de stimulants de la réponse immunitaire innés et adaptatifs. Le test sert à détecter la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez les personnes immunodéprimées ayant subi une transplantation d'organes solides.

QFM est destiné à être utilisé en combinaison avec une évaluation des risques ainsi que d'autres évaluations médicales et diagnostiques.

Résumé et explication du test

L'immunodéficience est caractérisée par une capacité réduite à développer efficacement une réponse immunitaire. Cette réponse compromise ou absente peut résulter d'une immunodéficience primaire ou acquise (secondaire) (1).

Les immunodéficiences primaires sont généralement héréditaires et elles sont caractérisées par des déficiences de composants distincts du système immunitaire adaptatif ou inné (1). Néanmoins, la plupart des immunodéficiences sont acquises (secondaires) et peuvent être induites par des agents pathogènes, des médicaments (un traitement immunosuppresseur après une transplantation d'organes par exemple), des états pathologiques (un cancer, une leucémie ou un lymphome par exemple) ou par des polluants environnementaux (1).

La base moléculaire de l'immunodéficience est variée. Toutefois, l'immunité à médiation cellulaire joue un rôle clé dans l'induction de nombreuses manifestations cliniques observées. Actuellement, le diagnostic et la gestion des syndromes d'immunodéficience dépendent de l'agent responsable (2, 3).

Par exemple, la gestion *ad hoc* représente la norme dans le cadre du suivi du statut de l'immunodéficience cellulaire des sujets ayant subi une transplantation d'organes solides et suivant un traitement médicamenteux immunosuppresseur. Le statut de la réponse immunitaire du sujet est généralement mesuré grâce au suivi des taux de médicaments pharmacologiques et à l'évaluation clinique/pathologique du fonctionnement de la greffe (2, 3).

Un certain nombre de tests du fonctionnement des lymphocytes T mesurent l'immunité à médiation cellulaire aux mitogènes tels que la phytohémagglutinine (PHA), le mitogène de la phytolaque et la concanavaline A (ConA). Cependant, ces derniers mesurent uniquement la capacité fonctionnelle des lymphocytes T et constituent un sous-ensemble des cellules impliquées dans l'immunité à

médiation cellulaire. Il est de plus en plus évident que les mécanismes immunitaires innés contribuent fortement à la défense de l'hôte, que ce soit en agissant seuls ou en améliorant les réponses des lymphocytes T spécifiques. Par conséquent, les réponses fonctionnelles des cellules immunitaires innées (lymphocytes NK) et adaptatives (lymphocytes T) forment une analyse plus complète de l'immunité à médiation cellulaire (2, 3).

QFM est un test de diagnostic *in vitro* utilisant une combinaison de stimulants (sous la forme d'un culot LyoSphere™) qui stimule spécifiquement différents types de cellules impliquées dans les systèmes immunitaires innés et adaptatifs. On mesure le statut immunitaire fonctionnel d'un sujet en mesurant la réponse à la stimulation du système immunitaire inné et adaptatif à l'aide d'agonistes de récepteurs de type Toll (TLR) et de récepteurs des cellules T (TCR), respectivement. La détection d'interféron gamma (IFN-γ) par ELISA offre une mesure qualitative et quantitative de la fonction immunitaire à médiation cellulaire.

Principes du test

Le test QFM utilise des stimulants lyophilisés (QFM LyoSpheres™), qui sont ajoutés au sang total héparinisé. L'incubation du sang dure 16 à 24 heures avant le prélèvement de plasma et la recherche d'IFN-γ produit en réponse aux stimulants.

Le test QFM s'effectue par étapes. Tout d'abord, le sang total est prélevé dans le tube de prélèvement sanguin QFM. Puis un QFM LyoSphere est ajouté au tube qui sera ensuite incubé à 37 °C dès que possible et dans les 8 heures suivant le prélèvement. À la suite d'une période d'incubation de 16 à 24 heures, les tubes sont centrifugés, le plasma est retiré et la quantité d'IFN-γ (reportée en unités internationales par ml, UI/ml) est mesurée par ELISA et comparée à un intervalle de valeurs attendues pour définir la réponse immunitaire du sujet.

QFM est un test offrant une mesure qualitative et quantitative de la fonction immunitaire. Il se peut que les résultats de QFM ne quantifient pas directement le niveau d'immunodépression.

La quantité d'IFN-γ dans les échantillons de plasma peut souvent dépasser les limites supérieures de la plupart des lecteurs ELISA, même lorsque les individus sont moyennement immunodéprimés. Il est recommandé de diluer les échantillons de plasma au 1 pour 10 et/ou au 1 pour 100 dans le diluant vert et de réaliser un test ELISA à l'aide de plasma non dilué.

Remarque : le seuil du test QFM peut varier selon le niveau d'immunodépression du sujet et les paramètres de transplantation individuels.

Voir « Interprétation des résultats » à la page 25 de cette notice pour obtenir un aperçu de l'interprétation des résultats QFM.

Temps requis pour effectuer le test

Le temps requis pour effectuer le test QFM est estimé ci-dessous. Le temps requis pour tester plusieurs échantillons en lots est aussi indiqué.

Incubation à 37 °C des tubes de sang : 16 à 24 heures

ELISA : Environ 3 heures pour une microplaque ELISA (jusqu'à 88 échantillons)

< 1 heure de travail

Ajouter 10 à 15 minutes pour chaque microplaque supplémentaire

Composants et stockage

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
N° de référence	**0650-0701**
Nombre de préparations	**10**
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 flacons
Notice QuantiFERON Monitor LyoSpheres	1

Tubes de prélèvement sanguin QuantiFERON Monitor	
N° de référence	**0650-0101**
Nombre de préparations	**100**
Tubes de prélèvement sanguin QuantiFERON Monitor (bouchon blanc, anneau blanc)	100 tubes
Notice des tubes de prélèvement QuantiFERON Monitor	1

Composants du kit 2 plaques ELISA QuantiFERON Monitor	**Kit 2 plaques ELISA**
N° de référence	**0650-0201**
Bandelettes pour microplaques, 12 × 8 puits (enduites d'anticorps monoclonaux IFN-γ murins anti-humains)	2 jeux de bandelettes pour microplaques 12 × 8 puits
IFN-γ Standard, lyophilized (standard IFN-γ, lyophilisé ; contient de l'IFN-γ humain recombinant, de la caséine bovine, du thimérosal 0,01 % m/v)	1 × flacon (8 UI/ml si reconstitué)
Green Diluent (diluant vert ; contient de la caséine bovine, du sérum normal de souris, du thimérosal 0,01 % m/v)	1 × 30 ml flacon
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (concentré de conjugué 100×, lyophilisé ; IFN-γ HRP murin anti-humain, contient du thimérosal 0,01 % m/v)	1 × 0,3 ml si reconstitué
Wash Buffer 20× Concentrate (concentré de tampon de lavage 20× ; pH 7,2, contient du ProClin® 300 0,05 % v/v)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (solution de substrat enzymatique ; contient du H_2O_2, 3,3', 5,5' tétraméthylbenzidine)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (solution de blocage d'enzyme ; contient 0,5 M H_2SO_4)*	1 × 15 ml
Notice QuantiFERON Monitor ELISA	1

* Contient de l'acide sulfurique. Voir page 11 pour les précautions d'emploi.

Matériel nécessaire (mais non fourni)

- Incubateur à 37 °C* ; CO_2 non requis
- Pipettes à volume variable calibrées*
- Pipettes multicanaux calibrées* à 50 µl et 100 µl avec embouts jetables
- Agitateur de microplaque*
- Eau déionisée ou distillée, 2 litres
- Laveur de microplaque (laveur automatique recommandé)
- Laveur de microplaque* équipé d'un filtre de 450 nm et d'un filtre de référence de 620 nm à 650 nm
- Cylindre gradué (éprouvette graduée)
- Serviette absorbante à faible peluchage

Stockage et manipulation

Tubes de prélèvement sanguin

Stocker les tubes de prélèvement sanguin à une température comprise entre 4 °C et 25 °C. Les tubes de prélèvement QFM doivent être à une température comprise entre 17 °C et 25 °C au moment du remplissage et du mélange.

LyoSpheres

Stocker les QFM LyoSpheres entre 2 °C et 8 °C.

Réactifs de kit ELISA

Stocker les réactifs de kit ELISA entre 2 °C et 8 °C.

Toujours protéger la solution de substrat enzymatique de la lumière directe du soleil.

* S'assurer que les instruments ont été vérifiés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

Réactifs ELISA reconstitués et inutilisés

Pour obtenir des instructions sur la reconstitution des réactifs ELISA, voir « Étape 2 - IFN-γ ELISA » à la page 18.

- Le standard de kit reconstitué peut être conservé jusqu'à 3 mois s'il est stocké entre 2 °C et 8 °C.

  Noter la date à laquelle le standard de kit a été reconstitué.

- Une fois reconstitué, le concentré de conjugué 100× inutilisé doit être stocké entre 2 °C et 8 °C et utilisé dans les 3 mois.

  Noter la date à laquelle le conjugué a été reconstitué.

- Le conjugué concentré prêt à l'emploi doit être utilisé dans les 6 heures suivant sa préparation (voir tableau 1).
- Le tampon de lavage concentré prêt à l'emploi peut être stocké à température ambiante (22 °C ± 5 °C) jusqu'à 2 semaines.

Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

Avertissements

- QFM est un test offrant une mesure qualitative et quantitative de la fonction immunitaire. Il se peut que les résultats de QFM ne quantifient pas directement le niveau d'immunodépression.
- Les résultats des tests QFM doivent être utilisés conjointement avec la présentation clinique, les antécédents médicaux et d'autres indicateurs cliniques, lors de l'établissement du statut immunitaire d'un patient.
- Le seuil du test QFM peut varier selon le niveau d'immunodépression du sujet et les paramètres de transplantation individuels.

Précautions

Utilisation prévue uniquement pour le diagnostic *in vitro*

AVERTISSEMENT : le sang et le plasma humains doivent être manipulés comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Observer les directives de manipulation du sang et des produits sanguins en vigueur. Mettre au rebut les échantillons et le matériel en contact avec le sang ou les produits sanguins conformément aux réglementations nationales, régionales et locales en vigueur.

Les mentions de danger et conseils de prudence suivants s'appliquent aux composants du QuantiFERON Monitor ELISA.

Mentions de danger

QuantiFERON Conjugate (Conjugué QuantiFERON)

Contient: boric acid. Danger! Peut nuire à la fertilité ou au foetus. Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin. Se procurer les instructions avant utilisation. Garder sous clef. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution
(Solution de blocage d'enzyme QuantiFERON)

Contient: sulfuric acid. Danger! Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Peut être corrosif pour les métaux. Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/ se doucher. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Garder sous clef. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution
(Solution de substrat enzymatique QuantiFERON)

Attention! Provoque une légère irritation cutanée. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.

QuantiFERON Green Diluent
(Diluant vert QuantiFERON)

Contient: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo) pyrazole-3-carboxylate. Attention! Peut provoquer une allergie cutanée. Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

QuantiFERON IFN-γ Standard
(Standard IFN-γ QuantiFERON)

Contient: boric acid. Danger! Peut nuire à la fertilité ou au foetus. Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin. Se procurer les instructions avant utilisation. Garder sous clef. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate
(Concentré de tampon de lavage 20× QuantiFERON)

Contient: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Attention! Peut provoquer une allergie cutanée. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

Autres informations

Fiches de données de sécurité : www.qiagen.com/safety

- Tout écart par rapport à la *notice QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA* peut entraîner des résultats erronés. Lire attentivement les instructions avant toute utilisation.
- Inspecter les flacons QFM LyoSphere avant de les utiliser. Ne pas utiliser le LyoSphere si le flacon présente des signes d'endommagement ou que l'étanchéité du joint en caoutchouc a été affectée.
- Manipuler soigneusement les flacons cassés et prendre les précautions de sécurité nécessaires pour les éliminer en toute sécurité.
- Afin de réduire le risque de blessures causées par les capsules métalliques présentes sur les couvercles QFM LyoSphere, utiliser une pince à dessertir pour ouvrir les flacons.
- Ne pas utiliser le kit ELISA si un flacon de réactif présente des signes d'endommagement ou de fuite avant son utilisation.

- Ne pas mélanger ou utiliser les bandelettes pour microplaque, le standard IFN-γ, le diluant vert ou le concentré conjugué 100× de différents lots de kit QFM ELISA. Les autres réactifs (concentré de tampon de lavage 20×, solution de substrat enzymatique et solution de blocage d'enzyme) peuvent être interchangés entre les kits si les réactifs ne sont pas périmés et que les détails du lot sont enregistrés.
- Éliminer les réactifs inutilisés et échantillons biologiques conformément aux réglementations sécuritaires et environnementales en vigueur au niveau local et national.
- Ne pas utiliser les tubes de prélèvement sanguin QFM, les QFM LyoSpheres ou le QFM ELISA après la date d'expiration.
- S'assurer que l'équipement de laboratoire a été calibré/validé pour utilisation.

Prélèvement et manipulation des échantillons

Le test QFM doit être effectué uniquement à l'aide de sang total prélevé dans un tube de prélèvement sanguin contenant de l'héparine de lithium ou directement dans un tube de prélèvement sanguin QFM ; 1 ml de sang total est requis par test. Les tubes de prélèvement sanguin doivent être étiquetés de manière appropriée et l'heure du prélèvement sanguin doit être indiquée.

Important : la stimulation des échantillons sanguins QFM (p. ex. l'ajout d'un QFM LyoSphere à un aliquot sanguin d'1 ml) et leur incubation ultérieure à 37 °C doivent avoir lieu dans les 8 heures suivant le prélèvement sanguin.

Avant l'incubation, maintenir les échantillons sanguins à température ambiante (22 °C ± 5 °C).

Pour des résultats optimaux, respecter les procédures suivantes :

1. **Étiqueter correctement les tubes.**

   S'assurer que le tube de prélèvement sanguin QFM est étiqueté de manière appropriée, à savoir qu'il présente les informations sur le sujet et l'heure du prélèvement sanguin.

2. **Pour chaque sujet, prélever 1 ml de sang par ponction veineuse directement dans un tube de prélèvement sanguin QFM. Cette procédure doit être effectuée par un phlébotomiste expérimenté.**

   Remarque importante : les tubes doivent être à une température comprise entre 17 °C et 25 °C au moment du remplissage.

   Les tubes de prélèvement sanguin QFM peuvent être utilisés à une altitude maximale de 810 mètres au-dessus du niveau de la mer.

Comme le prélèvement sanguin pour des tubes d'1 ml est relativement lent, conserver le tube sur l'aiguille pendant 2 à 3 secondes une fois qu'il semble s'être rempli à la hauteur souhaitée. Cela permet de s'assurer que le bon volume est prélevé.

La marque noire située sur le côté des tubes de prélèvement sanguin QFM indique un volume de remplissage à 1 ml. Les tubes de prélèvement sanguin QFM sont fabriqués pour aspirer 1 ml ± 10 % et leurs performances sont optimales dans cet intervalle. Si le niveau de sang obtenu dépasse les limites définies par la ligne d'indication, un nouvel échantillon sanguin doit être prélevé.

Si une aiguille « papillon » est utilisée pour le prélèvement sanguin, utiliser un tube de purge pour veiller à ce que la tubulure soit remplie de sang avant que les tubes de prélèvement sanguin QFM ne soient employés.

Dans le cas d'une utilisation des tubes de prélèvement sanguin QFM à une altitude supérieure à 810 mètres ou si le volume de sang est trop faible, prélever le sang à l'aide d'une seringue avant d'en transférer immédiatement 1 ml dans le tube de prélèvement sanguin QFM. Pour des raisons de sécurité, la meilleure méthode consiste à retirer l'aiguille de la seringue en respectant les procédures de sécurité adéquates, à retirer le bouchon du tube de prélèvement sanguin QFM et à ajouter 1 ml de sang (jusqu'au centre du marquage noir situé sur le côté de l'étiquette du tube). Replacer correctement le bouchon et mélanger comme décrit ci-dessous.

En cas d'utilisation d'un garrot, celui-ci doit être desserré dès que l'aiguille pénètre dans la veine pour éviter les variations de pression qui pourraient affecter le volume de sang.

Le sang peut aussi être prélevé dans un tube de prélèvement sanguin générique contenant de l'héparine de lithium comme anticoagulant avant d'être transféré dans un tube de prélèvement sanguin QFM. Utiliser uniquement l'héparine de lithium comme anticoagulant car les autres anticoagulants interfèrent avec le test. Remplir un tube de prélèvement sanguin (volume minimal 3 ml) et mélanger doucement en retournant le tube plusieurs fois pour dissoudre l'héparine. Maintenir le sang à température ambiante (22 °C ± 5 °C) avant de le transférer dans les tubes de prélèvement sanguin QFM pour une stimulation à l'aide d'un QFM LyoSphere. S'assurer que le sang est bien mélangé en retournant doucement le tube juste avant de répartir les échantillons. Distribuer un aliquot d'1 ml de sang dans un tube de prélèvement sanguin QFM. Réaliser la distribution dans des conditions d'asepsie en respectant les procédures de sécurité adéquates lors du retrait du bouchon du tube de prélèvement sanguin QFM et de l'ajout

d'1 ml de sang (jusqu'à la marque noire située sur le côté de l'étiquette du tube). Replacer correctement les bouchons des tubes et mélanger comme décrit ci-dessous.

3. **Immédiatement après avoir rempli les tubes, retourner le tube plusieurs fois pour dissoudre l'héparine.**

   Important : le secouement trop énergique des tubes peut provoquer une perturbation du gel et entraîner des résultats aberrants.

4. **Juste avant l'utilisation, amener les QFM LyoSpheres à température ambiante (22 °C ± 5 °C).**

5. **Dans des conditions d'asepsie, ajouter un QFM LyoSphere à 1 ml de sang.**

   Déboucher le tube de prélèvement sanguin.

   Tapoter légèrement le flacon QFM LyoSphere sur une surface dure pour s'assurer que le QFM LyoSphere est situé au fond du flacon. Déboucher le flacon QFM LyoSphere en commençant par retirer la capsule métallique puis le bouchon de caoutchouc.

   Verser soigneusement le QFM LyoSphere dans l'échantillon de sang d'1 ml en alignant le bord du flacon de verre à celui du tube de prélèvement sanguin QFM, puis retourner le flacon avec précaution pour transférer le QFM LyoSphere dans le tube de prélèvement sanguin QFM (voir figure 1).

   Important : si le QFM LyoSphere est versé en dehors du tube de prélèvement sanguin QFM, celui-ci doit être jeté et un autre flacon QFM LyoSphere doit être ouvert.

   Important : ne pas laisser le flacon QFM LyoSphere ouvert pendant une période prolongée. Le QFM LyoSphere doit être ajouté au sang dès que le flacon est débouché.

   Si les QFM LyoSpheres sont ajoutés au sang prélevé dans un tube de prélèvement sanguin QFM, veiller à ce que les bouchons des tubes soient remis sur les échantillons correspondants.

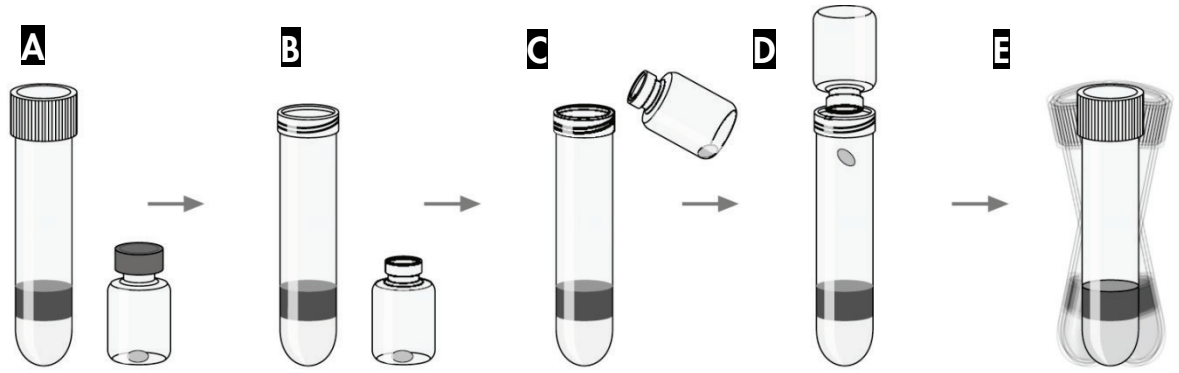


Figure 1. Ajout de QFM LyoSphere. **A** Tube de prélèvement sanguin QFM et flacon QFM LyoSphere. **B** Retirer le bouchon du tube de prélèvement sanguin QFM ainsi que la capsule métallique et le bouchon de caoutchouc du flacon QFM LyoSphere. **C** Ajouter immédiatement le QFM LyoSphere au sang en alignant le bord du flacon de verre à celui du tube de prélèvement. **D** Retourner ensuite le flacon avec précaution pour transférer le LyoSphere dans le tube de prélèvement. **E** Remettre le bouchon sur le tube de prélèvement sanguin QFM et agiter 5 à 10 fois.

6. **Mettre le bouchon sur le tube de prélèvement sanguin QFM et agiter 5 à 10 fois, suffisamment fort pour s'assurer que le QFM LyoSphere est complètement dissous.**

   Si un QFM LyoSphere adhère à la surface interne du tube, il est possible de le dissoudre en recouvrant le LyoSphere de sang lorsque le tube est retourné.

   S'assurer que le tube est bouché une fois que le QFM LyoSphere a été ajouté pour empêcher l'ajout accidentel d'un second LyoSphere dans le même tube.

   Remarque : le QFM LyoSphere étant blanc, il ne sera plus visible dans le sang une fois dissous.

   Important : le secouement trop énergique des tubes peut provoquer une perturbation du gel et entraîner des résultats aberrants.

7. **À la suite de l'ajout et de la dissolution du QFM LyoSphere, les tubes de prélèvement sanguin QFM doivent être transférés dans un incubateur à 37 °C ± 1 °C dès que possible et dans les 8 heures suivant le prélèvement sanguin.**

Instructions d'utilisation

Étape 1 - incubation du sang et prélèvement du plasma

Matériel fourni

- Tubes de prélèvement sanguin QFM (se référer à « Composants et stockage », page 6).

Matériel nécessaire (mais non fourni)

- Voir « Matériel nécessaire (mais non fourni) », page 8.

Procédure

1. **Incuber les tubes de prélèvement sanguin QFM contenant des aliquots d'1 ml de sang avec le QFM LyoSphere DEBOUT à 37 °C ± 1 °C de 16 à 24 heures.**

   Remarque : l'incubateur ne nécessite pas de CO_2 ou d'humidification.

   Après l'incubation, les tubes de prélèvement sanguin QFM peuvent rester entre 4 °C et 27 °C jusqu'à 3 jours avant d'être centrifugés.

2. **Après l'incubation, le prélèvement du plasma est facilité par la centrifugation des tubes de prélèvement sanguin pendant 15 minutes de 2 000 à 3 000 × *g* (FCR). Le module de gel séparera les cellules du plasma. Si cela ne se produit pas, recentrifuger les tubes.**

   Il est possible de prélever le plasma sans centrifugation, mais il faudra faire particulièrement attention à le retirer sans perturber les cellules.

3. **Les échantillons de plasma doivent être prélevés uniquement à l'aide d'une pipette.**

   Important : après la centrifugation, éviter le pipetage répété ou le mélange du plasma par d'autres moyens avant de le prélever. Prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel, quelle que soit l'étape.

   Les échantillons de plasma peuvent être chargés directement depuis les tubes de prélèvement sanguin QFM centrifugés vers la microplaque QFM ELISA, y compris lorsque des stations de travail ELISA automatiques sont utilisées.

   Les échantillons de plasma peuvent être stockés jusqu'à 28 jours entre 2 °C et 8 °C ou, s'ils sont prélevés, au-dessous de -20 °C pendant des périodes prolongées. Les aliquots des échantillons de plasma prélevés doivent être scellés avant d'être stockés.

En cas de prélèvement d'échantillons de plasma, prélever au moins 150 µl de plasma pour permettre une répétition des tests si nécessaire.

La quantité d'IFN-γ dans les échantillons de plasma peut souvent dépasser les limites supérieures de la plupart des lecteurs ELISA, même lorsque les individus sont moyennement immunodéprimés. Il est recommandé de diluer les échantillons de plasma au 1:10 et/ou au 1:100 dans le diluant vert et de réaliser un test ELISA à l'aide de plasma non dilué (voir Étape 2 - IFN-γ ELISA).

Étape 2 - IFN-γ ELISA

Matériel fourni

- Composants du kit 2 plaques ELISA QuantiFERON Monitor (se référer à « Composants et stockage », page 6).

Matériel nécessaire (mais non fourni)

- Voir « Matériel nécessaire (mais non fourni) », page 8.

Préparation

L'IFN-γ dans le plasma peut souvent dépasser les limites supérieures de la plupart des lecteurs ELISA, même lorsque les individus sont moyennement immunodéprimés. Recommandation : diluer les échantillons de plasma au 1:10 et/ou au 1:100 dans le diluant vert et réaliser un test ELISA à l'aide de plasma non dilué.

Si le patient est gravement immunodéprimé, la préparation et le test d'un seul échantillon de plasma non dilué peut suffire à obtenir un résultat quantitatif.

Remarque : les résultats des échantillons se trouvant dans l'intervalle du QFM ELISA (jusqu'à 10 UI/ml) doivent être utilisés pour l'interprétation des résultats. La dilution la plus faible générant un résultat compris dans l'intervalle du QFM ELISA doit être utilisée en tant que résultat reporté (en prenant en compte le facteur de dilution) si le plasma non dilué est situé au-dessus de l'intervalle du QFM ELISA.

Procédure

1. **Tous les échantillons de plasma et réactifs, sauf le concentré de conjugué 100×, doivent être amenés à température ambiante (22 °C ± 5 °C) avant d'être utilisés. Attendre au moins 60 minutes pour l'équilibration.**
2. **Retirer du cadre de microplaque les bandelettes superflues, les resceller dans la poche en aluminium et les replacer au réfrigérateur où elles seront stockées jusqu'à utilisation.**

   Prévoir au moins une bandelette pour les standards QFM et suffisamment de bandelettes pour le nombre de sujets testés. Après utilisation, conserver le cadre et le couvercle pour un emploi ultérieur avec les bandelettes restantes.
3. **Reconstituer le standard IFN-γ lyophilisé avec le volume d'eau déionisée ou distillée indiqué sur l'étiquette du flacon du standard. Mélanger doucement pour réduire la formation de mousse et pour garantir une solubilisation complète. La reconstitution du standard au volume indiqué produira une solution à une concentration de 8,0 UI/ml.**

   Important : le volume de reconstitution du standard IFN-γ diffère selon les lots. Consulter l'étiquette du flacon du standard pour veiller à utiliser le volume adéquat d'eau déionisée ou distillée.

   Utiliser le standard du kit reconstitué pour produire une série de dilution à 1 pour 2 suivie d'une série de dilution à 1 pour 4 de l'IFN-γ dans le diluant vert (DV) (voir figure 2). Le S1 (standard 1) contient 4,0 UI/ml, le S2 (standard 2) 1,0 UI/ml, le S3 (standard 3) 0,25 UI/ml et le S4 (standard 4) 0 UI/ml (DV seul). Les standards doivent être testés en duplicats. Préparer des dilutions fraîches du standard de kit pour chaque session ELISA.

Procédure recommandée pour les standards dupliqués
a. Étiqueter les 4 tubes « S1 », « S2 », « S3 », « S4 ».
b. Ajouter 150 µl de DV à S1, S2, S3 et S4.
c. Ajouter 150 µl du standard du kit à S1 et mélanger soigneusement.
d. Transférer 50 µl de S1 à S2 et mélanger soigneusement.
e. Transférer 50 µl de S2 à S3 et mélanger soigneusement.
f. Le Diluant vert (DV) seul sert de standard zéro (S4).

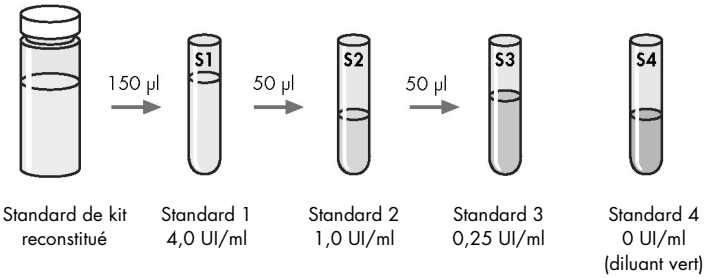


Figure 2. Préparation de la courbe de standard.

4. Reconstituer le concentré de conjugué 100× lyophilisé avec 0,3 ml d'eau déionisée ou distillée. Mélanger doucement pour réduire la formation de mousse et pour garantir une solubilisation complète du conjugué.

Le conjugué concentré prêt à l'emploi est préparé en diluant la quantité requise de concentré de conjugué 100× reconstitué dans le diluant vert (tableau 1 - Préparation du conjugué). Ramener tout concentré de conjugué 100× non utilisé à une température comprise entre 2 °C et 8 °C immédiatement après emploi. Utiliser uniquement du diluant vert.

Tableau 1. Préparation du conjugué

Nombre de bandelettes	Volume du concentré de conjugué 100×	Volume de diluant vert
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. **Pour les échantillons de plasma prélevés dans les tubes de prélèvement sanguin puis stockés ou congelés, mélanger les échantillons avant de les ajouter au puits ELISA.**

   Important : si les échantillons de plasma sont ajoutés directement depuis les tubes QFM centrifugés, tout mélange du plasma doit être évité. Prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel, quelle que soit l'étape.

6. **Recommandation : diluer les échantillons de plasma au 1:10.**
   - Ajouter 90 µl de diluant vert (DV) dans un tube dont l'étiquette présente les informations sur le patient et « 1:10 ».
   - Ajouter ensuite 10 µl des échantillons de plasma mélangés (voir l'étape 5 pour distinguer les échantillons de plasma mélangés de ceux ajoutés directement à partir de tubes QFM centrifugés).
   - Mélanger soigneusement à l'aide d'une pipette, pour réduire la formation de mousse.

7. **Recommandation : diluer les échantillons de plasma au 1:100.**
   - Préparer une dilution au 1:10 (voir l'étape 6 ci-dessus).
   - Ajouter 90 µl de diluant vert dans un tube dont l'étiquette présente les informations sur le patient et « 1:100 ».
   - Ajouter 10 µl de dilution au 1:10.
   - Mélanger soigneusement à l'aide d'une pipette, pour réduire la formation de mousse.

   Recommandation : tester les échantillons suivants en parallèle et dans l'ordre suivant :
   - Non dilué, 1:10, 1:100

   Les options suivantes liées aux échantillons de sujets sont également prises en charge par le logiciel d'analyse QFM :
   - Non dilué
   - 1:10
   - 1:100
   - 1:10, 1:100
   - Non dilué, 1:10
8. **Ajouter 50 µl du conjugué concentré prêt à l'emploi fraîchement préparé dans les puits ELISA requis à l'aide d'une pipette multicanaux.**
9. **Ajouter 50 µl d'échantillon de plasma de test dans les puits appropriés à l'aide d'une pipette multicanaux. Ajouter ensuite 50 µl de chacun des standards 1 à 4. Tester les standards en double.**
10. **Couvrir chaque microplaque avec un couvercle et mélanger le conjugué et les échantillons/standards de plasma soigneusement en utilisant un agitateur de microplaque pendant 1 minute. Éviter les projections.**
11. **Incuber à température ambiante (22 °C ± 5 °C) pendant 120 ± 5 minutes.**

    Les microplaques ne doivent pas être exposées à la lumière directe du soleil pendant l'incubation.
12. **Au cours de l'incubation, diluer 1 mesure du concentré du tampon de lavage 20× avec 19 mesures d'eau déionisée ou distillée et mélanger soigneusement. Une quantité suffisante de concentré de tampon de lavage 20× est fournie pour préparer 2 litres de tampon de lavage concentré prêt à l'emploi.**

    Laver les puits avec 400 µl de tampon de lavage concentré prêt à l'emploi pendant au moins 6 cycles dans un laveur de microplaque. Un laveur de microplaque automatique est recommandé.

Il est essentiel de procéder soigneusement au lavage avant d'exécuter le test. Veiller à ce que chaque puits soit **complètement rempli** de tampon de lavage pour chaque cycle de lavage. Recommandation : faire tremper les puits pendant au moins 5 secondes entre chaque cycle pour un meilleur résultat.

Ajouter du désinfectant de laboratoire standard au réservoir d'effluent et suivre les procédures établies pour la décontamination de matériel potentiellement infectieux.

13. **Placer les microplaques face vers le bas sur une serviette absorbante à faible peluchage pour éliminer tout résidu de tampon de lavage. Ajouter 100 µl de solution de substrat enzymatique dans chaque puits, couvrir chaque microplaque avec un couvercle et mélanger soigneusement à l'aide d'un agitateur de microplaque.**
14. **Incuber à température ambiante (22 °C ± 5 °C) pendant 30 minutes.**

    Les microplaques ne doivent pas être exposées à la lumière directe du soleil pendant l'incubation.
15. **Après l'incubation, ajouter 50 µl de solution de blocage d'enzyme dans chaque puits et mélanger soigneusement à l'aide d'un agitateur de microplaque.**

    La solution de blocage d'enzyme doit être ajoutée aux puits dans le même ordre et à environ la même vitesse utilisée lors de l'ajout de la solution de substrat enzymatique à l'étape 13.
16. **Mesurer la densité optique (DO) dans les 5 minutes de blocage de la réaction à l'aide d'un lecteur de microplaque équipé d'un filtre 450 nm ainsi que d'un filtre de référence de 620 nm à 650 nm. Les valeurs DO sont utilisées pour calculer les résultats.**

Calculs et interprétation du test

Le logiciel d'analyse QuantiFERON Monitor permet d'analyser les données brutes et de calculer les résultats. Il est disponible sur www.QuantiFERON.com. S'assurer que la version la plus récente du logiciel d'analyse QuantiFERON Monitor est utilisée.

Le logiciel effectue une évaluation de contrôle qualité du test, génère une courbe de standard et fournit un résultat de test pour chaque sujet, comme détaillé dans la section Interprétation des résultats.

Si le plasma non dilué dépasse la limite supérieure (10 UI/ml) du QFM ELISA, le logiciel d'analyse QuantiFERON Monitor rapporte la dilution la plus faible générant un résultat compris dans l'intervalle du QFM ELISA, en prenant en compte le facteur de dilution.

En alternative à l'utilisation du logiciel d'analyse QuantiFERON Monitor, les résultats peuvent aussi être déterminés selon la méthode suivante.

Génération de la courbe de standard

(si le logiciel d'analyse QuantiFERON Monitor n'est pas utilisé)

Déterminer les valeurs DO moyennes des réplicats du standard du kit sur chaque microplaque.

Construire une courbe de standard $\log_{(e)}$-$\log_{(e)}$ en traçant le $\log_{(e)}$ de la DO moyenne (axe y) par rapport au $\log_{(e)}$ de la concentration IFN-γ des standards en UI/ml (axe x), en omettant le standard zéro dans ces calculs. Calculer la ligne de meilleur ajustement pour la courbe de standard par analyse de régression.

Utiliser la courbe de standard pour déterminer la concentration IFN-γ (UI/ml) de chacun des échantillons de plasma de test à l'aide de la valeur DO de chaque échantillon.

Ces calculs peuvent être effectués à l'aide des packs logiciels disponibles avec les lecteurs de microplaque ainsi qu'avec les tableurs standards ou logiciels statistiques (comme Microsoft® Excel®). Il est recommandé d'utiliser ces logiciels pour calculer l'analyse de régression, le coefficient de variation (%CV) pour les standards ainsi que le coefficient de corrélation (*r*) de la courbe de standard.

Le résultat rapporté doit provenir de la dilution la plus faible générant un résultat compris dans l'intervalle du QFM ELISA (en prenant en compte le facteur de dilution) si le plasma non dilué est situé au-dessus de l'intervalle du QFM ELISA.

Contrôle qualité du test

L'exactitude des résultats du test dépend de l'exactitude de la génération de la courbe de standard. Ainsi, il convient d'examiner les résultats dérivés des standards avant d'interpréter les résultats des échantillons du test.

Pour que le dosage ELISA soit valide :

- La valeur DO moyenne du standard 1 doit être ≥ 0,600.
- Le %CV des valeurs DO des réplicats du standard 1 et du standard 2 doit être ≤ 15 %.
- Les valeurs DO des réplicats pour les standards 3 et 4 ne doivent pas varier de plus de 0,040 unité de densité optique par rapport à leur moyenne.
- Le coefficient de corrélation (*r*) calculé à partir des valeurs d'absorbance moyennes des standards doit être ≥ 0,98.

Le logiciel d'analyse QuantiFERON Monitor calcule et rapporte ces paramètres de contrôle qualité.

Si les critères ci-dessus ne sont pas respectés, l'analyse est invalide et doit être répétée.

La valeur DO moyenne du standard zéro (diluant vert) doit être ≤ 0,150. Si la valeur DO moyenne est > 0,150, la procédure de lavage de microplaque doit être examinée.

Interprétation des résultats

Les résultats QFM sont interprétés selon la réponse IFN-γ aux stimulants immunitaires innés et adaptatifs. Le test QFM offre une mesure qualitative et quantitative de la fonction immunitaire. Il se peut que les résultats de QFM ne quantifient pas directement le niveau d'immunodépression.

Important : lors de l'établissement du statut immunitaire d'un patient, le niveau d'IFN-γ mesuré doit être utilisé conjointement avec la présentation clinique, les antécédents médicaux et d'autres évaluations diagnostiques (tableau 2). Le seuil du test QFM peut varier selon le niveau d'immunodépression du sujet et les paramètres de transplantation individuels.

Tableau 2. Interprétation des résultats

Résultat QFM d'IFN-γ (UI/ml)	Classification	Interprétation
< 15	Faible	Le sujet a une faible réponse d'IFN-γ aux stimulants immunitaires innés et adaptatifs
15-1000	Modérée	Le sujet a une réponse modérée d'IFN-γ aux stimulants immunitaires innés et adaptatifs
> 1000	Élevée	Le sujet a une réponse élevée d'IFN-γ aux stimulants immunitaires innés et adaptatifs

Si le niveau d'IFN-γ mesuré d'un échantillon de plasma non dilué est inférieur à 0,1 UI/ml :

- S'assurer que le QFM LyoSphere a été ajouté à l'échantillon sanguin et que le tube a été incubé conformément à cette notice.
- Veiller à ce que le résultat d'IFN-γ corresponde au statut clinique actuel du sujet.

Si des problèmes techniques sont suspectés avec le prélèvement ou la manipulation des échantillons sanguins, répéter tout le test QFM avec un nouvel échantillon sanguin. Répéter le test ELISA d'échantillons de plasma stimulé s'il semble possible que le test original ait dévié de la procédure décrite dans cette notice (voir la section Contrôle qualité du test pour plus d'informations).

Le médecin peut souhaiter répéter le test si les résultats ne concordent pas avec le statut clinique actuel du sujet.

Limites

Les résultats du test QFM doivent être utilisés en combinaison avec les antécédents cliniques, le statut médical actuel et d'autres évaluations diagnostiques de chaque individu. Les laboratoires peuvent choisir d'établir leurs propres intervalles pour le test.

Les laboratoires peuvent également choisir d'analyser un échantillon de contrôle externe prélevé sur un sujet sain parallèlement aux échantillons de patients.

Les résultats non fiables ou inexacts peuvent survenir dans les cas suivants :

- Anticoagulant sanguin incorrect : utiliser uniquement l'héparine de lithium car les autres anticoagulants interfèrent avec le test.
- Déviations par rapport à la procédure décrite dans cette notice.
- Niveaux excessifs d'IFN-γ circulant ou présence d'anticorps hétérophiles.
- Plus de 8 heures entre le prélèvement de l'échantillon sanguin et l'incubation à 37 °C.
- Remplissage excessif ou insuffisant des tubes de sang QFM en dehors de l'intervalle de 0,9 à 1,1 ml.

Caractéristiques des performances

Études cliniques

Deux études cliniques ont été menées pour évaluer les réponses des individus apparemment sains (n = 114) en comparaison des receveurs de greffe (n = 30). Parmi les receveurs de greffe, 18 faisaient partie de la cohorte de post-transplantation précoce (post-Tx précoce, au cours des 3 mois suivant la transplantation) et 12 faisaient partie de la cohorte de post-transplantation tardive ou cohorte stable (post-Tx tardive, > 12 mois après la transplantation).

- Les prélèvements d'échantillons ont été effectués jusqu'à 5 fois pour chaque individu de la cohorte de post-transplantation précoce (3 mois après la transplantation, n = 64 échantillons).
- Les prélèvements d'échantillons ont été effectués 1 fois pour chaque individu de la cohorte de post-transplantation tardive (n = 12 échantillons).
- Les prélèvements d'échantillons ont été effectués 1 fois pour chaque individu de la cohorte d'individus apparemment sains (n = 114).

Les réponses à QFM étaient comprises entre faible et modérée pour les échantillons des cohortes de post-transplantation précoce et tardive. Dans la cohorte de post-transplantation précoce, le pourcentage de réponses comprises dans l'intervalle de réponses faibles était plus élevé (93,8 %) que le pourcentage de réponses comprises dans l'intervalle de réponses modérées (6,3 %), alors que dans la cohorte de post-transplantation tardive, les réponses comprises dans l'intervalle de réponses faibles étaient de 25 % et celles comprises dans l'intervalle de réponses modérées de 66,7 % (tableau 3). Aucune réponse de la cohorte de post-transplantation précoce ne figurait dans l'intervalle de réponses élevées, et seulement 1 (8,3 %) réponse parmi les échantillons de la cohorte de post-transplantation tardive figurait dans l'intervalle de réponses élevées. Les réponses QFM de la cohorte d'individus apparemment sains figuraient principalement dans l'intervalle de réponses modérées (83,3 %) et dans l'intervalle de réponses élevées (15,8 %) (tableau 3).

Tableau 3. Intervalle de réponse QFM chez les sujets apparemment sains en comparaison des receveurs de greffe

IFN-γ (UI/ml)	**Catégorie de résultats**	**%* post-Tx précoce IC à 95 % n**	**%* post-Tx tardive IC à 95 % n**	**%* sujets apparemment sains IC à 95 % n**	**Résultats totaux**
< 15	Faible	93,8 % 85,0-97,5 n = 60	25,0 % 8,9-53,2 n = 3	0,9 % 0,2-4,8 n = 1	**64**
15-1000	Modérée	6,3 % 2,5-15,0 n = 4	66,7 % 39,1-86,2 n = 8	83,3% 75,4-89,1 n = 95	**107**
> 1000	Élevée	0,0 % 0-5,7 n = 0	8,3 % 1,5-35,4 n = 1	15,8 % 10,2-23,6 n = 18	**19**
Échantillons totaux		**64**	**12**	**114**	**190**

* Les pourcentages indiquent la proportion des échantillons au sein de chaque cohorte de donneurs compris dans l'intervalle de réponse particulier.

Valeurs attendues

La répartition des réponses IFN-γ à QFM chez les patients en post-transplantation précoce (jusqu'à 3 mois après la transplantation) a été déterminée à partir de 64 échantillons prélevés à partir de 18 receveurs de greffe au moyen du test QFM ELISA (figure 3).

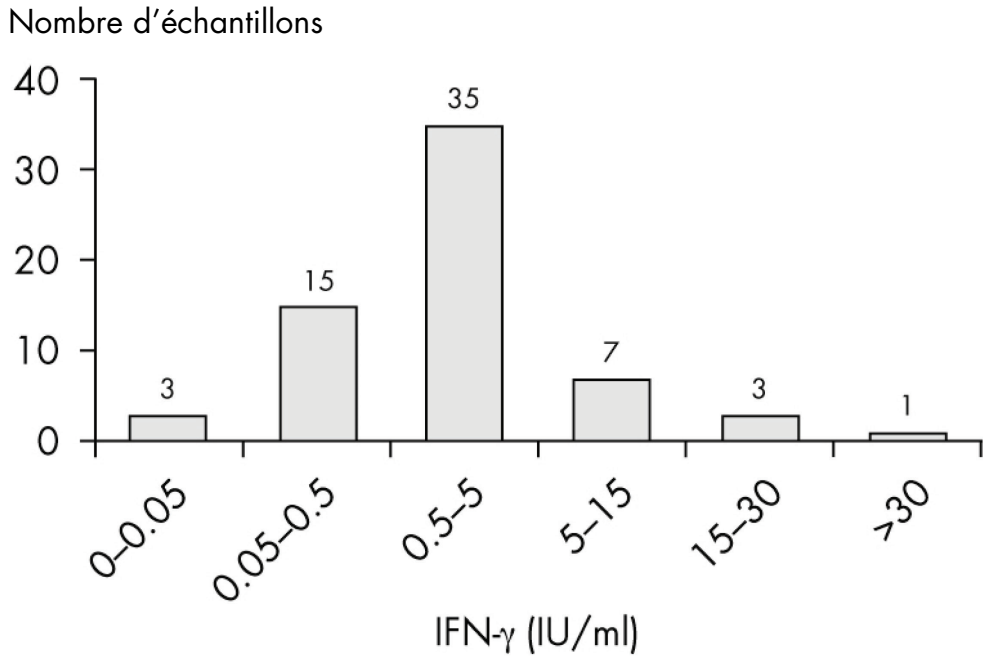


Figure 3. Répartition des réponses IFN-γ à QFM chez les patients en post-transplantation précoce (n = 64 ; médiane = 1,5 UI/ml).

La répartition des réponses IFN-γ à QFM chez les patients en post-transplantation tardive (> 12 mois après la transplantation) a été déterminée à partir de 12 échantillons au moyen du test QFM ELISA (figure 4).

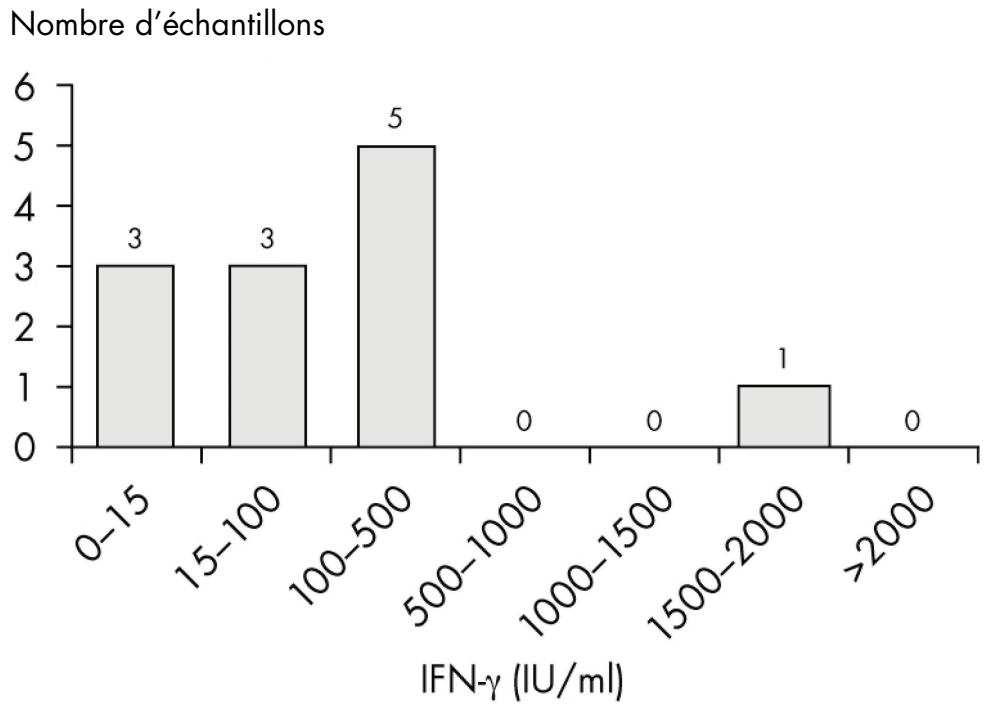


Figure 4. Répartition des réponses IFN-γ à QFM chez les patients en post-transplantation tardive (n = 12 ; médiane = 98,8 UI/ml).

La répartition des réponses IFN-γ à QuantiFERON Monitor chez les sujets apparemment sains a été déterminée à partir de 114 échantillons au moyen du test QFM ELISA (figure 5).

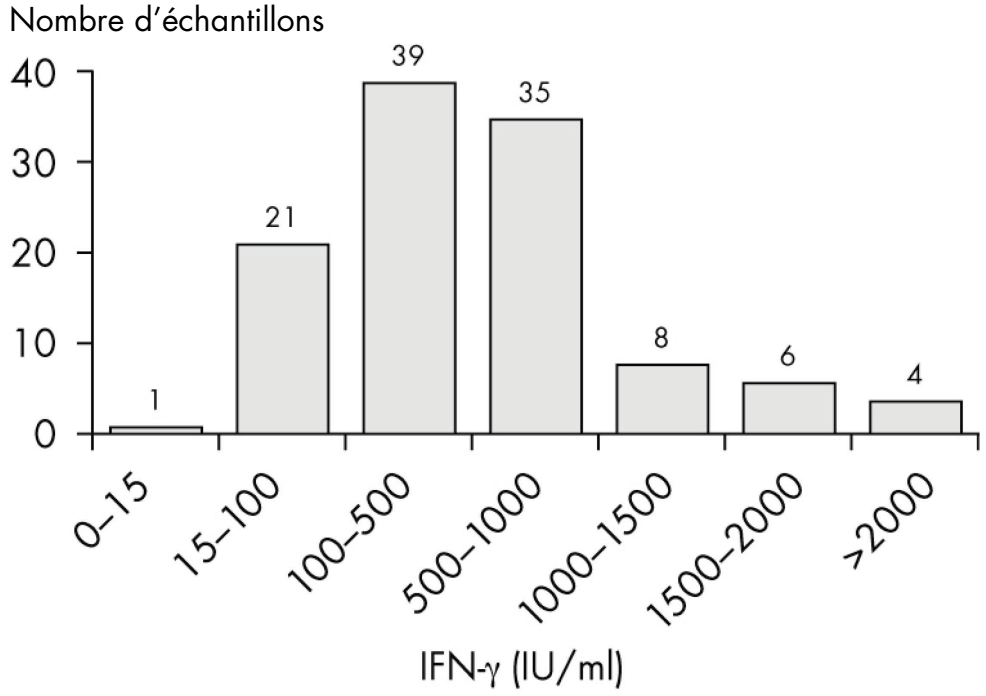


Figure 5. Répartition des réponses IFN-γ à QFM chez les sujets apparemment sains (n = 114 ; médiane = 400,5 UI/ml).

Réponses à QFM chez les patients ayant subi une transplantation d'organes solides

QFM a été évalué dans le cadre d'une étude d'observation transversale chez les patients ayant subi une transplantation d'organes solides (4). L'étude comprenait : 212 sujets sains incluant un sous-groupe de 30 contrôles de même sexe et de même âge, 30 patients en pré-transplantation, 18 patients en post-transplantation précoce (66 échantillons ; durée médiane post-transplantation = 21 jours) et 11 patients en post-transplantation tardive (durée médiane post-transplantation = 2 290 jours). La production d'IFN-γ moyenne était de 555,2 UI/ml chez les contrôles sains et de 614,6 UI/ml chez les contrôles de même sexe et de même âge. La production moyenne d'IFN-γ s'est révélée considérablement moins élevée chez les patients en pré-transplantation (IFN-γ = 89,3 UI/ml) et en post-transplantation précoce (IFN-γ = 3,76 UI/ml) que chez les contrôles de même sexe et de même âge ($p < 0,001$). La restauration de la fonction immunitaire chez les patients en post-transplantation tardive (IFN-γ moyen = 256,1 UI/ml) a été observée et s'est avérée considérablement supérieure à celle des patients en post-transplantation précoce ($p < 0,05$). Cette étude montre que QFM peut être utilisé pour évaluer la fonction immunitaire à médiation cellulaire chez les personnes immunodéprimées ayant subi une transplantation d'organes solides.

Caractéristiques des performances du test

Il a été démontré que le test QFM ELISA est linéaire. Pour ce faire, 5 réplicats de 11 pools de plasma de concentrations IFN-γ connues ont été placés de manière aléatoire sur la microplaque ELISA. La droite de régression linéaire présente une pente de 1,002 ± 0,011 et un coefficient de corrélation de 0,99 (figure 6).

La limite de détection du test QFM ELISA est de 0,05 UI/ml et il n'existe aucune preuve d'un effet crochet à haute dose (prozone) avec les concentrations d'IFN-γ jusqu'à 10 000 UI/ml.

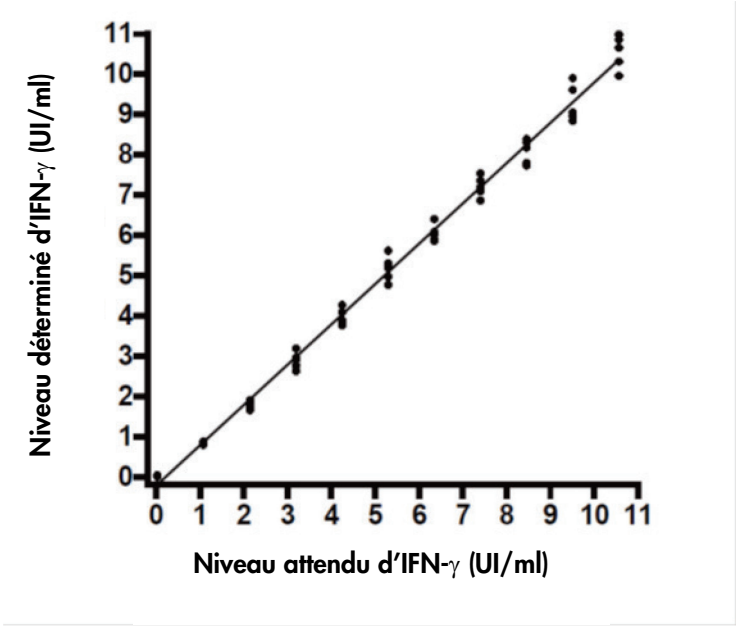


Figure 6. Profil de linéarité du test QFM ELISA déterminé à partir de l'analyse de 5 réplicats de 11 échantillons de plasma de concentrations IFN-γ connues.

La reproductibilité du test QFM (étape 1) a été déterminée à l'aide d'échantillons sanguins de 20 sujets sains. Trois opérateurs, lots QFM LyoSphere et ensembles d'équipement différents ont été évalués. Le coefficient moyen de variation des niveaux de réponse IFN-γ déterminé à l'aide du test QFM ELISA sur l'ensemble des trois lots de QFM LyoSpheres et dans toutes les conditions testées était de 22,22 % (IC 95 % : 17,20-27,25).

La répétabilité du test QFM (étape 1) a été évaluée en mesurant la variabilité de 5 à 6 stimulations de sang QFM LyoSphere répétées à partir du même donneur auprès de 14 sujets. Le coefficient moyen de variation observé chez les 14 sujets testés était de 14,7 % (IC 95 % : 10,2-19,2). Le %CV des sujets individuels était inférieur à 30 %.

La reproductibilité du test QFM ELISA (étape 2) a été estimée. Pour ce faire, 3 opérateurs ont testé 20 échantillons de plasma présentant différentes concentrations d'IFN-γ dans des réplicats de 3, dans 3 laboratoires et pendant 3 jours non consécutifs. Chaque échantillon a ainsi été testé 27 fois dans le cadre de 9 analyses indépendantes. L'un des échantillons était un contrôle zéro présentant une concentration IFN-γ calculée de 0,08 UI/ml (IC 95 % : 0,07-0,09). Sur les 19 échantillons de plasma restants, les concentrations étaient comprises entre 0,33 (IC 95 % : 0,31-0,34) et 7,7 UI/ml (IC 95 % : 7,48-7,92).

L'imprécision intratest (au sein d'une même analyse) a été estimée au moyen du calcul de la moyenne des coefficients de variation (%CV) de chaque plasma de test contenant de l'IFN-γ issu de chaque analyse de microplaque (n = 9). L'imprécision est comprise entre 4,1 et 9,1 %CV. Le %CV intratest moyen (IC°± 95 %) était de 6,6 % ± 0,6%. La moyenne du plasma IFN-γ zéro était de 14,1 %CV.

L'imprécision totale ou intertest a été déterminée par comparaison des 27 concentrations calculées d'IFN-γ pour chaque échantillon de plasma. L'imprécision intertest était comprise entre 6,6 et 12,3 %CV. Le %CV moyen global (IC°± 95 %) était de 8,7 % ± 0,7 %. Le plasma IFN-γ zéro présentait un CV de 26,1 %. Ce niveau de variation est prévisible car la concentration calculée d'IFN-γ est faible et la variation pour une estimation de concentration faible est supérieure à celle pour des concentrations plus élevées.

Informations techniques

Échantillons de plasma coagulé

Si des caillots de fibrine apparaissent avec le stockage à long terme des échantillons de plasma, centrifuger les échantillons pour sédimenter la matière coagulée et faciliter le pipetage du plasma.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, voir également les informations techniques fournies sur : www.QuantiFERON.com. Pour les coordonnées, voir la quatrième de couverture.

Dépannage ELISA

Développement de couleur non spécifique

Cause possible	Solution
a) Lavage incomplet de la microplaque	Laver la microplaque au moins 6 fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage. Plus de 6 cycles de lavage peuvent être requis en fonction du laveur utilisé. Une période de trempage d'au moins 5 secondes doit être effectuée entre chaque cycle.
b) Contamination croisée des puits ELISA	Prendre garde lors du pipetage et du mélange des échantillons pour réduire les risques.
c) Kit/composants périmés	S'assurer que le kit est utilisé avant la date de péremption. S'assurer que le standard reconstitué et le concentré de conjugué 100× sont utilisés dans les 3 mois suivant la date de reconstitution.
d) Solution de substrat enzymatique contaminée	Rejeter le substrat en cas de coloration bleue. S'assurer que les réservoirs de réactif sont propres.
e) Mélange du plasma dans les tubes QFM avant le prélèvement	Après la centrifugation, éviter le pipetage répété ou le mélange du plasma par d'autres moyens avant de le prélever. Prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel, quelle que soit l'étape.

Lectures de faible densité optique pour les standards

Cause possible	Solution
a) Erreur de dilution du standard	S'assurer que les dilutions du standard de kit sont préparées correctement conformément à la présente notice.

Dépannage ELISA

b) Erreur de pipetage	S'assurer que les pipettes sont calibrées et utilisées conformément aux instructions du fabricant.
c) Température d'incubation trop faible	L'incubation d'ELISA doit être effectuée à température ambiante (de 17 °C à 27 °C).
d) Période d'incubation trop courte	Incuber la microplaque avec le conjugué, les standards et les échantillons pendant 120 ± 5 minutes. Incuber la solution de substrat enzymatique sur la microplaque pendant 30 minutes.
e) Mauvais filtre de lecteur de microplaque utilisé	La microplaque doit être lue à 450 nm avec un filtre de référence de 620 à 650 nm.
f) Les réactifs sont trop froids	Tous les réactifs, à l'exception du concentré de conjugué 100×, doivent être amenés à température ambiante avant le début du test, ce qui prend environ une heure.
g) Kit/composants périmés	S'assurer que le kit est utilisé avant la date de péremption. S'assurer que le standard reconstitué et le concentré de conjugué 100× sont utilisés dans les 3 mois suivant la date de reconstitution.

Bruit de fond élevé

Cause possible	Solution
a) Lavage incomplet de la microplaque	Laver la microplaque au moins 6 fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage. Plus de 6 cycles de lavage peuvent être requis en fonction du laveur utilisé. Une période de trempage d'au moins 5 secondes doit être effectuée entre chaque cycle.
b) Température d'incubation trop élevée	L'incubation d'ELISA doit être effectuée à température ambiante (de 17 °C à 27 °C).

c) Kit/composants périmés	S'assurer que le kit est utilisé avant la date de péremption. S'assurer que le standard reconstitué et le concentré de conjugué 100× sont utilisés dans les trois mois suivant la date de reconstitution.
d) Solution de substrat enzymatique contaminée	Rejeter le substrat en cas de coloration bleue. S'assurer que les réservoirs de réactif sont propres.

Courbe de standard non linéaire et variabilité des duplicats

Cause possible	Solution
a) Lavage incomplet de la microplaque	Laver la microplaque au moins 6 fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage. Plus de 6 cycles de lavage peuvent être requis en fonction du laveur utilisé. Une période de trempage d'au moins 5 secondes doit être effectuée entre chaque cycle.
b) Erreur de dilution du standard	S'assurer que les dilutions du standard sont préparées correctement conformément à la présente notice.
c) Mélange insuffisant	Mélanger soigneusement les réactifs par inversion ou en les vortexant doucement avant de les ajouter à la microplaque.
d) Technique de pipetage incohérente ou interruption pendant la mise en place du test	L'ajout des échantillons et des standards doit être effectué de manière continue. Tous les réactifs doivent être préparés avant le début du test.

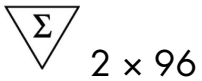
Les informations produit et les guides techniques sont disponibles gratuitement auprès de QIAGEN, via votre distributeur ou sur le site www.QuantiFERON.com.

Références

Une liste complète de références QFM est disponible sur Gnowee, la bibliothèque de référence QuantiFERON, accessible sur www.gnowee.net.

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2012) *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Sanders.
2. Fernández-Ruiz, M., Kumar, D., and Humar, A. (2014) Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. Clin. Transl. Immunol. **3**, e12.
3. Sood, S. and Testro, A.G. (2014) Immune monitoring post liver transplant. World J. Transplant. **4**, 30.
4. Sood, S. (2014) A novel biomarker of immune function and initial experience in a transplant population. Transpl. J. **97**, e50.

Symboles

	Suffisant pour 2 × 96 préparations d'échantillons
	Fabricant autorisé
	Symbole de la certification CE-IVD
	Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*
	Code de lot
	Numéro de référence
	À utiliser avant le
	Limite de température
	Consulter les instructions d'utilisation
	Ne pas réutiliser
	Conserver à l'abri des rayons du soleil
	Représentant autorisé dans l'Union européenne

Coordonnées

Pour une assistance technique ou pour de plus amples informations, appeler le numéro gratuit 00800-22-44-6000, consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse www.qiagen.com/contact ou contacter l'un des départements d'assistance technique (voir quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Résumé de la procédure du test

Étape 1 - incubation du sang

1. Prélever le sang du patient dans un tube de prélèvement QFM ou un tube de prélèvement sanguin contenant de l'héparine de lithium. Étiqueter les tubes en incluant les informations sur le patient et l'heure du prélèvement sanguin avant de les transporter vers le laboratoire à température ambiante dans les 8 heures suivant le prélèvement.
    a. Si le sang a été prélevé dans un tube de prélèvement sanguin contenant de l'héparine de lithium, aliquoter 1 ml de sang dans le tube de prélèvement sanguin QFM, puis l'étiqueter en incluant les informations sur le patient et l'heure du prélèvement sanguin.

2. Ajouter 1 QFM LyoSphere à chaque tube de prélèvement sanguin QFM contenant 1 ml de sang, dissoudre le LyoSphere, puis incuber les tubes dès que possible (dans les 8 heures suivant le prélèvement sanguin) **debout** pendant 16 à 24 heures à 37 °C.

3. Après l'incubation, centrifuger les tubes pendant 15 minutes de 2 000 à 3 000 × *g* (FCR) pour séparer le plasma et les globules rouges.

4. Après la centrifugation, éviter le pipetage répété ou le mélange du plasma par d'autres moyens avant de le prélever. Prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel, quelle que soit l'étape.

Étape 2 - IFN-γ ELISA

1. Amener les composants ELISA, à l'exception du concentré de conjugué 100×, à température ambiante pendant au moins 60 minutes.

2. Reconstituer le standard du kit à 8,0 UI/ml avec de l'eau distillée ou déionisée. Préparer 4 dilutions de standard.
3. Reconstituer le concentré de conjugué 100× lyophilisé avec de l'eau distillée ou déionisée.

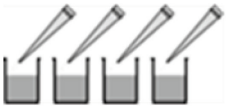
4. Préparer le conjugué concentré prêt à l'emploi dans le diluant vert et ajouter 50 µl dans tous les puits.

5. Ajouter 50 µl des échantillons de plasma de test (non dilués, dilutions au 1:10 et 1:100 suivant le cas) et 50 µl de standards aux puits appropriés. Mélanger avec l'agitateur.

6. Incuber pendant 120 ± 5 minutes à température ambiante.

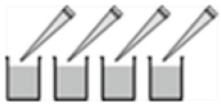
7. Laver les puits au moins 6 fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage.

8. Ajouter 100 µl de solution de substrat enzymatique aux puits. Mélanger avec l'agitateur.

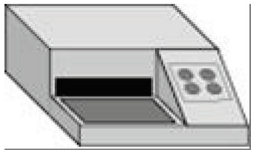


9. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.

10. Ajouter 50 µl de solution de blocage d'enzyme aux puits. Mélanger avec l'agitateur.



11. Lire les résultats à 450 nm avec un filtre de référence de 620 à 650 nm.



12. Analyser les résultats.

Remarques

Remarques

Marques déposées : QIAGEN®, QFM®, QuantiFERON®, QuantiFERON Monitor® (groupe QIAGEN) ; LyoSphere™, LyoSpheres™ (BioLyph) ; Excel®, Microsoft® (Microsoft) ; ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Accord de licence limitée pour le kit QuantiFERON Monitor

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir le site www.qiagen.com.

© 2014 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

QIAGEN